Aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med Kurt Kochsiek

Untersuchungen zum Einfluß von vasoaktiven Peptiden auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel der Ratte.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von
Klaus Günter Nofz
aus Bad Hersfeld

Würzburg, den 28. Oktober 1981

1982

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med Kurt Kochsiek

Untersuchungen zum Einfluß von vasoaktiven Peptiden auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel der Ratte.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilian-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von
Klaus Günter Nofz
aus Bad Hersfeld

Würzburg, den 28. Oktober 1981

Referent:	Priv. Doz. Dr. med G. Schmid
Korreferent:	Prof. Dr. med K. Kochsiek
Dekan:	Prof. Dr. med K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

UNIV. LEIDEN BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543526_0049

E I N L E I T U N G

Die Regulation der Speicheldrüsen-Funktion wurde besonders in den letzten 10 Jahren sehr intensiv untersucht (Literatur bei SCHMID, 1980). Physiologische, pharmakologische und ultrastrukturelle Studien an der Parotis-Drüse der Ratte haben zur Identifizierung sowohl von α- und ß-adrenergen wie von cholinergen Rezeptoren geführt. Die Anwesentheit weiterer Rezeptoren, die durch andere Agonisten stimuliert werden können, scheint wahrscheinlich (RUDICH und BUTCHER, 1976; KREUSSER et al., 1974; HEALEY et al. 1976; CORONEO, 1977).

Viele molekulare Mechanismen der Regulationsabläufe im Rahmen der stimulo-sekretorischen Kopplung sind allerdings noch weitgehend ungeklärt. Als sog. intracellulärer "second messenger" verschiedener neurohormonaler bzw. hormonaler Stimuli wirkt neben Ca^{++} im wesentlichen das cyclische Adenosin 3',5'-monophosphat (cAMP) (SCHRAMM und SELINGER, 1975; BUTCHER, 1978). Cyclisches AMP wird dabei an der katalytischen Untereinheit des Adenylcyclase-Komplexes an der Innenseite der Zellmembran gebildet.

Das Nukleotid konnte in der Speichelflüssigkeit der Parotis-Drüse sowohl des Menschen (SCHAEFFER et al., 1973; SCHMID et al., 1974; KANAMORI et al., 1974) und der Ratte (SCHMID et al., 1976) nachgewiesen werden. Insbesondere durch Stimulation der ß-adrenergen Rezeptoren kann die cAMP-Ausscheidung im Parotis-Speichel gesteigert werden (SCHMID et al., 1975).

Bei pathologischen Zuständen, z.B. bei verschiedenen Formen arterieller Hypertonie, ist die cAMP-Ausscheidung

im Parotis-Speichel erhöht (SCHMID et al., 1974). Ursache für diese veränderte cAMP-Ausscheidungsrate beim Hochdruck könnte eine Änderung der Aktivität des sympathico-adrenalen Systems sein. Andererseits sind jedoch auch Effekte verschiedener vasoactiver Substanzen wie des Angiotensin II oder des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinin (als antihypertensiv wirkendes Prinzip) denkbar. Aus Untersuchungen von KREUSSER et al. (1974), HEALEY et al. (1976) und CORONEO (1977) ist bekannt, daß Angiotensin II direkte Effekte auf die Speichelzusammensetzung haben kann. Betrachtet man außerdem die hohe Konzentration von Kallikrein in den Speicheldrüsen, so kann angenommen werden, daß auch dessen Folgeprodukt Bradykinin in den Speicheldrüsen eine wichtige Funktion zukommen dürfte.

Über mögliche Einflüsse vasoaktiver Peptide wie des Angiotensin II oder des Bradykinin auf die Drüsenfunktion, insbesondere auf Bildung und Ausscheidung von cAMP im Parotisspeichel liegen bisher keine Daten in der Literatur vor. Um die veränderte cAMP-Ausscheidungsrate bei arterieller Hypertonie ursächlich besser beurteilen zu können, sollte in den vorliegenden Untersuchungen der Einfluß dieser Peptide auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel bei normotensiven Ratten untersucht werden. Durch weitere Untersuchungen an Reserpin-vorbehandelten Ratten sollte entschieden werden, ob es sich bei den, durch die vasoaktiven Peptide induzierten Veränderungen der cAMP-Ausscheidung um direkte oder um Katecholamin-vermittelte Effekte handelt.

METHODIK

TIERE UND TIERHALTUNG

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 180-220 g. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten Altromin^{R}-Standard Diät sowie Wasser ad libitum. Den Tieren wurde im allgemeinen eine Eingewöhnungszeit von mindestens 1-2 Wochen gewährt, bevor sie zu Versuchen verwendet wurden. Die Versuche wurden immer vormittags durchgeführt. Abends zuvor wurde die Nahrung jeweils abgesetzt.

KONTINUIERLICHE KOLLEKTION DES PAROTISSPEICHELS DER RATTE

Detaillierte Angaben über die kontinuierliche Kollektion des Parotisspeichels sind bei SCHMID et al. (1979) zu finden. Im folgenden sind die wesentlichen methodischen Schritte kurz dargelegt.

Allgemeine Versuchsvorbereitungen

Die Tiere wurden mit Inaktin^{R} (5-Äthyl-5-1'-methyl-propyl-2-thio-barbitursäure, Na^{+}-Salz) in einer Dosierung von 70 mg/kg Körpergewicht i.p. anaesthesiert und in Rückenlage auf einen elektrisch beheizten (37°C) Operationstisch fixiert. Anschließend wurde eine Tracheotomie mit Intubation durchgeführt, um eine Speichelaspiration während der Narkose zu vermeiden. Um einen Zugang zur ständigen

Abbildung 1: Topographische Lage der Glandula parotis der Ratte.
(a) Glandula parotis, (b) Hauptäste des Ductus parotideus, (c) Ductus parotideus, (d) Glandula lacrimalis und (e) Nervus facialis. (nach SCHMID, 1980).

Volumen-Substitution und zur Infusion der als Testsubstanzen verwendeten Pharmaka während der Experimente zu erhalten, wurde die Vena femoralis präpariert und kanüliert. Das durchschnittliche Infusionsvolumen betrug etwa 2 ml Ringer-Lösung pro Stunde.

Zur Kanülierung des Ductus parotideus wurden Ober- und Unterkiefer der rücklings aufliegenden Ratte mit Haltefäden derart fixiert, daß das Maul zu etwa 2/3 geöffnet war. Speziell angefertigte Polyäthylen-Katheter wurden von hinten und oben in die Öffnung des Ductus parotideus etwa 1-2 mm weit eingeführt; das weitere Vorschieben erfolgte aus einer Richtung von vorne her, um den vorderen Rand des Musculus masseter zu überwinden. Die Katheter wurden insgesamt 10 mm weit eingeschoben. Da die Aufzweigung des Ductus parotideus meist erst in einer Tiefe ab etwa 2 cm erfolgt, konnte bei diesem Vorgehen davon ausgegangen werden, daß stets Speichel aus dem gesamten Drüsenparenchym gesammelt wurde.

Zur Speichelkollektion wurden die Polyäthylen-Katheter mit graduierten Glaspipetten verbunden, so daß eine kontinuierliche Registrierung der Speichelflußrate möglich war. Die Speichelproben wurden als 10-Minuten Fraktionen gesammelt und -nach Vereinigung der Speichelproben aus beiden Seiten- sofort tiefgefroren ($-40^{\circ}C$).

Stimulation der Speichelsekretion

Da die spontane Sekretionsleistung zur Durchführung der Analytik nicht ausreichte, war eine Stimulation der Speichelsekretion notwendig. Stimuliert wurde mit Pilocarpin, welches initial in einer Dosis von 7 $mg \cdot kg^{-1}$ Körpergewicht subcutan injiziert und anschließend in einer Dosis von 0,045 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ subcutan

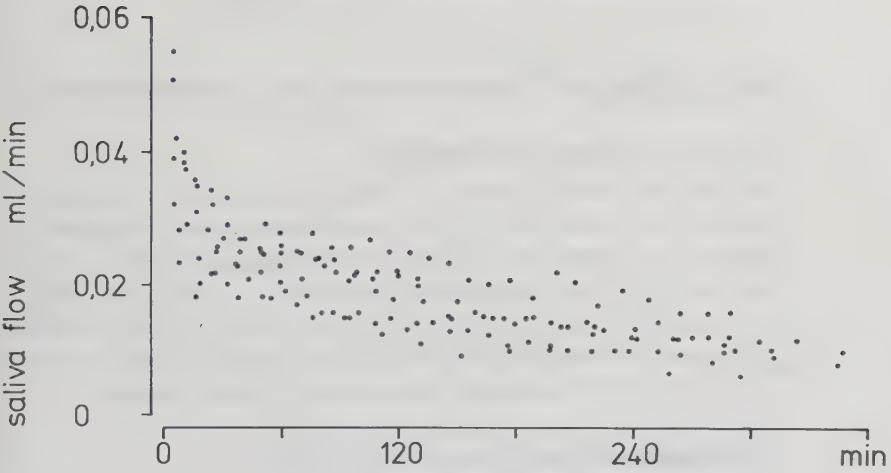

Abbildung 2: Speichelflußrate beider Parotisdrüsen während kontinuierlicher Pilocarpin-Applikation (n = 8) (nach SCHMID, 1980).

infundiert wurde. Die eigentliche Speichelkollektion setzte 20 Minuten nach Beginn der Pilocarpin-Applikation ein. Abbildung 2 zeigt die Speichelflußraten unter den beschriebenen Bedingungen. Das Verhalten von Blutdruck und Herzfrequenz während der angegebenen Pilocarpin-Applikation ist in Abbildung 3 dargestellt.

AUFARBEITUNG DER SPEICHELPROBEN UND SPEICHELANALYTIK

Aufarbeitung der Speichelproben

Die Speichelproben wurden zur Enteiweißung ultrafiltriert, nachdem sie jeweils mit 2 ml Aqua bidestillata versetzt wurden. Es wurde ein Vielfach-Filtrationsgerät (Nr. 3025) der Fa. Millipore verwendet. Dieses Gerät saugt mit etwa 50 mm Hg die Proben durch ein MF-Millipore^{R} - Membranfilter mit einer Porengröße von 45 /um. Das Ultrafiltrat, dessen Volumen jeweils gemessen wurde, wurde lyophilisiert.

Radioimmunologische Bestimmung von cAMP

Die Bestimmungsmethode mittels RIA beruht auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird dem Antikörper (Anti-cAMP) gleichzeitig eine bekannte Menge radioaktiven Antigens (125 J-cAMP) und eine zu bestimmende Menge nicht radioaktiven Antigens (cAMP der Probe) angeboten. Während der Inkubationszeit konkurrieren markiertes und nicht-markiertes Antigen um den gleichen Antikörper, so daß ein Überwiegen des nicht-markierten Antigens zu einer geringen Menge markierten Antigen-Antikörper-Komplexes führt und umgekehrt.

Zur radioimmunologischen Bestimmung von cAMP wurde ein kommerziell erhältlicher Kit der Fa. Schwarz/Mann (Heidelberg) verwendet. In diesem ist das markierte Antigen ein cAMP-Derivat (Succinyl-cAMP-Tyrosinmethylester, ^{125}J); der

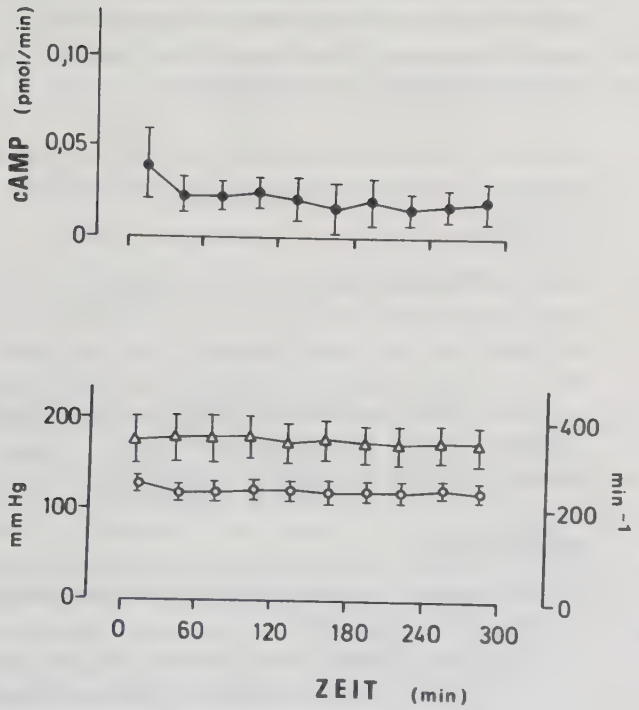

Abbildung 3: Verhalten des mittleren arteriellen Blutdrucks (o——o) und der Herzfrequenz (▲——▲) während kontinuierlicher Pilocarpin-Applikation (initial 7 mg · kg^{-1} s.c., gefolgt von 0,045 µg · kg^{-1} · min^{-1} s.c.). Als Zeitpunkt 0 des Versuches wurde die Zeit von 20 min nach Beginn der Pilocarpin-Applikation gewählt. Mittelwerte ± SD, n = 10. (Nach SCHMID, 1980)

Antikörper wurde in Kaninchen gegen eine Succinyl-cAMP-Albumin-Verbindung gewonnen. Bindungsstudien mit cGMP, AMP und ATP zeigten, daß dieser Antikörper als spezifisch für cAMP angesehen werden kann.

Die quantitative Bestimmung des cAMP in den Speichelproben erfolgte nach dem in Tabelle 1 dargestellten Pipettierschema.

Das Reaktionsgemisch wurde 19 Stunden bei $4^{o}C$ inkubiert. Die Trennung zwischen dem an den Antikörper gebundenem Antigen und dem freien Antigen erfolgte durch Proteinfällung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit 60% Ammoniumsulfat-Lösung und anschließender Abzentrifugation des gefällten Proteins (3000 Upm, $4^{o}C$, 10 min). Die ^{125}J-Aktivitäten in den Überständen und den Sedimenten wurden getrennt gemessen.

Berechnungen

a) Berechnung der Recovery des cAMP bei der Ultrafiltration der Speichelproben:

Trace-Versuche mit ^{3}H-cAMP ergaben, daß die cAMP-Konzentration in der verdünnten Speichelprobe und im Ultrafiltrat gleich war. Die Wiederfindung von cAMP im Ultrafiltrat entsprach damit dem jeweiligen Volumen-Verhältnis von Ultrafiltrat und verdünnter Speichelprobe.

b) Berechnung der Standard-Kurve:

Für die Standardkurve wurden entsprechend dem Pipettierschema cAMP-Standards im Bereich von 0.025 bis 10,0 pmol angesetzt. Die Berechnung des an AK gebundenen ^{125}J-cAMP (prozentual) wurde wie folgt durchgeführt:

$$\frac{CS - LW}{CU + CS - 2 \cdot LW} : 100 = \% \text{ geb } {}^{125}J\text{-cAMP}$$

wobei CS = Counts Sediment, CU = Counts Überstand und LW = Leerwert des Meßzählers sind.

c) Berechnung der cAMP-Konzentration in den Speichelproben:
Bei jeder einzelnen Probe wurde wie bei der Standardkurve der %-gebundene Anteil berechnet und der jeweilige cAMP-Wert in pmol an der Standarkurve abgelesen.

$$\frac{M \cdot F}{VU} = \text{pmol/ml Speichel}$$

wobei M = cAMP-Wert in pmol, entsprechend der Standardkurve, F = Verdünnungsfaktor und VU = Volumen Ultrafiltrat sind.

REGISTRIERUNG CARDIOVASCULÄRER PARAMETER

Als cardiovasculäre Parameter wurden Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck in 10-minütigen Intervallen registriert. Die Herzfrequenz wurde dabei durch Ableitung eines Extremitäten-EKG ermittelt; der arterielle Blutdruck wurde blutig in der Arteria femoralis über ein Hg-Manometer gemessen. Das Verhalten von Blutdruck und Herzfrequenz während der angegebenen Pilocarpin-Applikation ist in Abbildung 3 dargestellt.

E R G E B N I S S E

AUSSCHEIDUNG VON CYCLISCHEM AMP IM PAROTIS-SPEICHEL DER RATTE WÄHREND PARASYMPATHISCHER STIMULATION MIT PILOCARPIN

Abbildung 4 zeigt die cAMP-Ausscheidungsrate im Speichel sowie Blutdruck- und Herzfrequenz-Verhalten bei normotensiven Wistar-Ratten während kontinuierlicher Pilocarpin-Applikation (initial 7 mg · kg^{-1} Körpergewicht subcutan, mit sofort anschließender Infusion von 0,045 /ug · kg^{-1} · min^{-1} subcutan). Nach anfänglicher Zunahme der Herzfrequenz und Abnahme des arteriellen Blutdruckes (in dieser Abbildung nicht dargestellt, da der Zeitpunkt "0" der Speichelkollektion einer Zeit von 20 Minuten nach Beginn der Pilocarpin-Applikation entspricht) weisen Herzfrequenz und Blutdruck während der gesamten Versuchsdauer ein sehr konstantes Verhalten auf. Auch die cAMP-Excretion ist weitgehend konstant und beträgt im Mittel aus beiden Parotis-Drüsen 20-30 fmol pro Minute.

EFFEKTE VON TYRAMIN AUF DIE EXCRETION VON CYCLISCHEM AMP IM PAROTISSPEICHEL DER RATTE

In Abbildung 5 sind die Effekte von Tyramin auf die Excretion von cAMP im Parotisspeichel der Ratte dargestellt. Tyramin wurde intravenös in einer Dosis von 0,6 mg · kg^{-1} · min^{-1} Körpergewicht appliziert. Die cAMP-Ausscheidung steigt nach Tyramin-Gabe unmittelbar an und erreicht ein Maximum von etwa 70 fmol cAMP pro Minute während der ersten 10-20 Minuten. Nach etwa 30 Minuten erreichen die cAMP-Ausscheidungsraten im Parotisspeichel wieder Normalwerte.

Die Tyramin-Effekte lassen sich durch bereits vorher einsetzende Propanolol-Gabe (67 $/ug \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) hemmen (Abbildung 6).

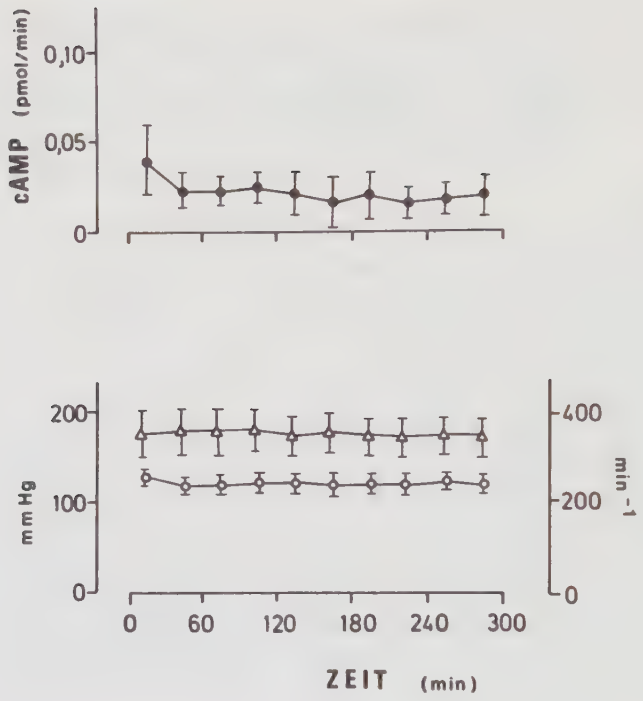

Abbildung 4: Ausscheidung von cAMP im Parotisspeichel beider Drüßen während kontinuierlicher Pilocarpin-Applikation; Mittelwert ± SD, n=10

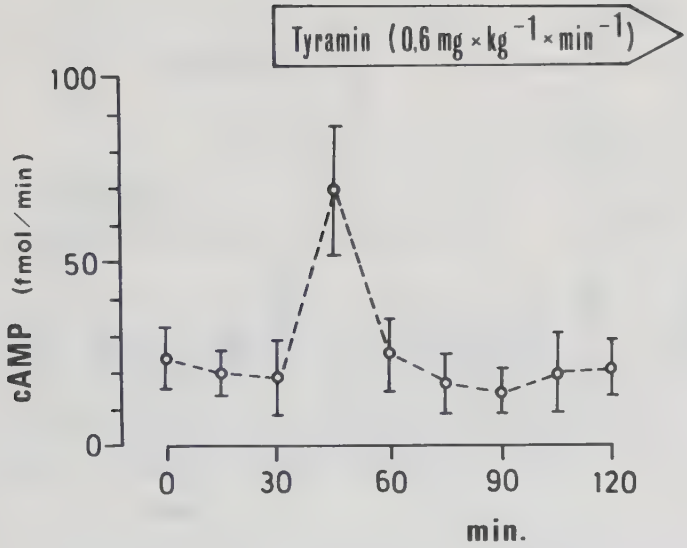

Abbildung 5: Effekt von Tyramin (0,6 mg • kg^{-1} • min^{-1} i.v.) auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel der Ratte (o——o); Mittelwert ± SD, n = 7.

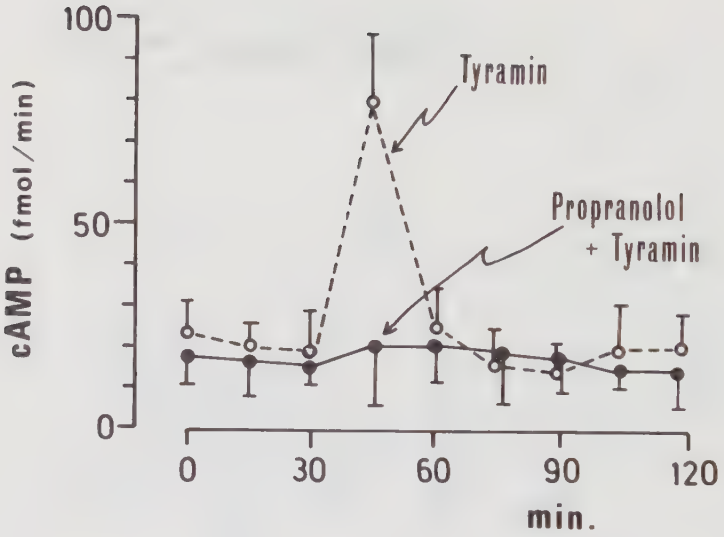

Abbildung 6: Einfluß von Propanolol (67 µg · kg^{-1} · min^{-1} i.v.) auf den Tyramin-induzierten Anstieg der cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel (o——o); Mittelwert ± SD, n = 6.

EINFLUSS VON ANGIOTENSIN II AUF DIE AUSSCHEIDUNG VON CYCLISCHEM AMP IM PAROTISSPEICHEL DER RATTE

Wie Abbildung 7 zeigt, kommt es durch Angiotensin II -Gabe zu einem Anstieg des arteriellen Blutdruckes mit einem Maximum nach etwa 2-3 Minuten. Danach pendelten sich die Blutdruckwerte auf ein Plateau ein, das etwa 20 mm Hg über den Ausgangswerten lag. Die Herzfrequenz blieb konstant.

Etwa 10 Minuten nach Einsetzen der Angiotensin II-Infusion kommt es zu einem Anstieg der cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel etwa um den Faktor 2. Die cAMP-Erhöhung läßt sich etwa 10-20 Minuten lang nachweisen und erreicht schließlich wieder Normalwerte (Abbildung 7).

Werden die Ratten mit Reserpin (1 mg $\cdot$ kg^{-1} i.p.) vorbehandelt, so führt Angiotensin II zu keinem cAMP-Anstieg im Parotisspeichel. Die cAMP-Ausscheidung der Reserpinbehandelten Ratten zeigt eine angedeutete, jedoch nicht signifikante Erniedrigung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Abbildung 8).

EINFLUSS VON BRADYKININ AUF DIE AUSSCHEIDUNG VON CYCLISCHEM AMP IM PAROTISSPEICHEL DER RATTE

Bradykinin, in einer Dosis von 3 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ intravenös infundiert, bewirkt einen Blutdruckabfall bei gleichzeitiger geringgradiger Zunahme der Herzfrequenz. Die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel wird durch Bradykinin-Applikation nicht signifikant beeinflußt (Abbildung 9).

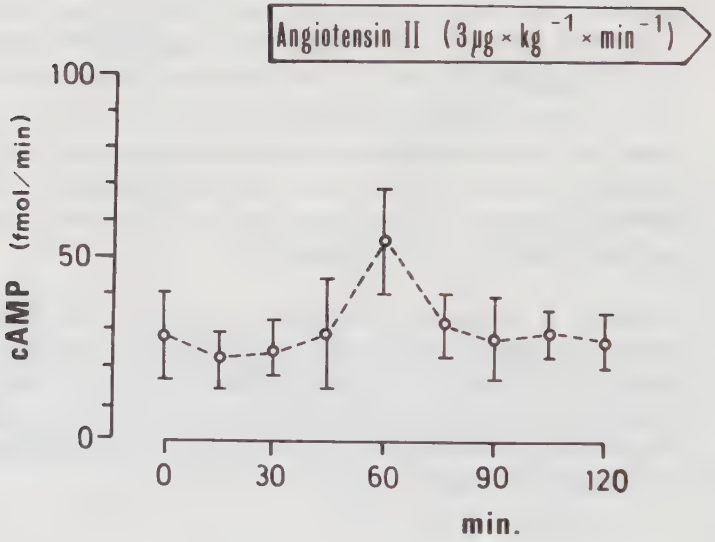

Abbildung 7: Effekt von Angiotensin II auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel der Ratte. Mittelwerte ± SD, n = 8.

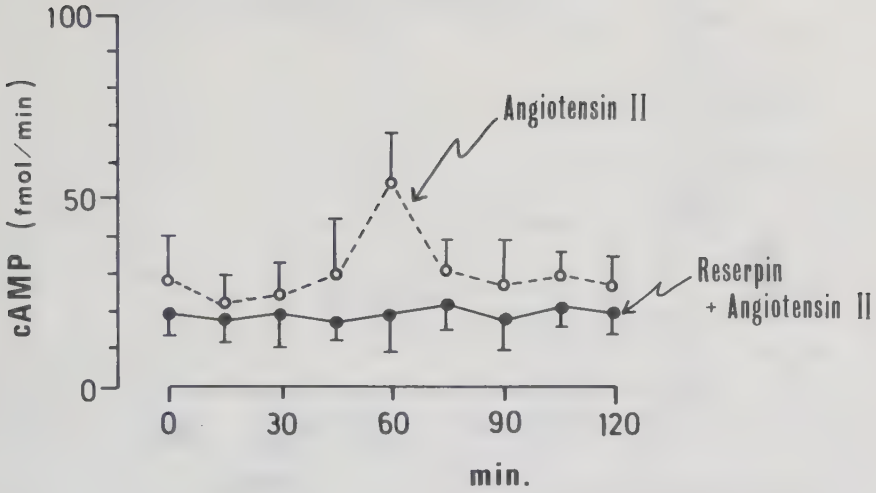

Abbildung 8: Einfluß von Angiotensin II auf die cAMP-Ausscheidung nicht vorbehandelter Ratten und mit Reserpin vorbehandelter (●——●) Ratten. Reserpin wurde in der entsprechenden Gruppe in einer Dosis von 1 mg • kg^{-1} intraperitoneal 12 Stunden vor Versuchsbeginn appliziert. Mittelwerte $\pm$ SD, n = 8 pro Gruppe.

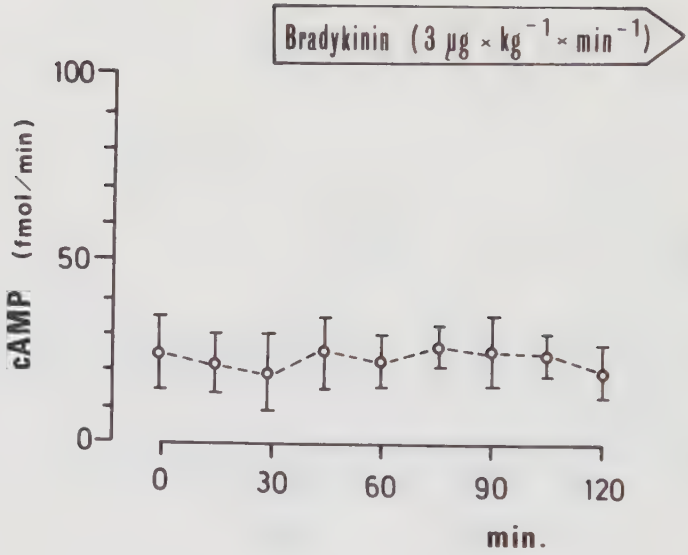

Abbildung 9: Einfluß von Bradykinin (3 µg · kg^{-1} · min^{-1} i.v.) auf die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel beider Drüsen. Mittelwerte ± SD, n = 6.

Tabelle 1:

PIPETTIER - SCHEMA:

	Gefäß Nr.	Na-acetat-Puffer	Standard (nicht markiertes Antigen	SCAMP-TME (125 J) markiertes Antigen	Antikörper
tandard A ,025 pmol	1 2	300 ul "	25 ul "	100 ul "	100 ul "
,050 pmol	3 4	250 ul "	50 ul "	100 ul "	100 ul "
,10 pmol	5 6	200 ul "	100 ul "	100 ul "	100 ul "
andard B .25 pmol	7 8	300 ul "	25 ul "	100 ul "	100 ul "
.50 pmol	9 10	250 ul "	50 ul "	100 ul "	100 ul "
.00 pmol	11 12	200 ul "	100 ul "	100 ul "	100 ul "
tandard C ,5 pmol	13 14	300 ul "	25 ul "	100 ul "	100 ul "
,0 pmol	15 16	250 ul "	50 ul "	100 ul "	100 ul "
,0 pmol	17 18	200 ul "	100 ul "	100 ul "	100 ul "
aximal- ert	19 20	400 ul "	--- ---	100 ul "	--- ---

D I S K U S S I O N

Bereits unter Pilocarpinstimulation ist cAMP im Parotisspeichel nachweisbar. Die mittlere Excretionsrate beider Drüsen der Ratte liegt bei 20-30 fmol/min. Die funktionelle Bedeutung des Speichel-cAMP ist bisher noch nicht geklärt. Ebenfalls ungeklärt ist die Art der Sekretion. Ein passives Austreten aus den Acinuszellen mit den Sekretgranula und ein aktiver Transportprozeß sind zu diskutieren. Nach Trace-Untersuchungen mit ^{32}P-cAMP stammt der weitaus überwiegende Teil des Speichel-cAMP aus der Drüse selbst (SCHMID, 1981) und könnte damit Aktivitätsverschiebungen im Drüsenparenchym reflektieren.

Die cAMP-Bildung in der Drüse dürfte entsprechend dem "second messenger concept" erfolgen, d.h. im Rahmen der Informationsübertragung extrazellulärer Signale auf das Zellinnere. Die funktionelle Einordnung des cAMP in die molekularen Mechanismen der Informationsübertragung sind in Abb. 10 dargestellt. Ein extrazellulärer Neurotransmitter oder ein Hormon lagern sich an den Zellmembranrezeptor an und stimulieren dadurch den Adenylcyclase-Komplex. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von cAMP aus ATP an der katalytischen Untereinheit des Adenylcyclase-Komplexes an der Innenseite der Zellmembran. Cyclisches AMP aktiviert schließlich die Proteinkinase, was zur Phosphorylierung von Proteinsubstraten und zu Enzymaktivierung führen kann. Es können verschiedene Neurotransmitter oder Hormone über das Adenylcyclase-System wirken. Die Spezifität liegt lediglich an der Rezeptoreinheit. Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, ist eine gesteigerte cAMP-Bildung als Hinweis auf eine verstärkte Aktivierung des Adenylcyclase-Komplexes bzw. der vorgeschalteten Mechanismen zu werten.

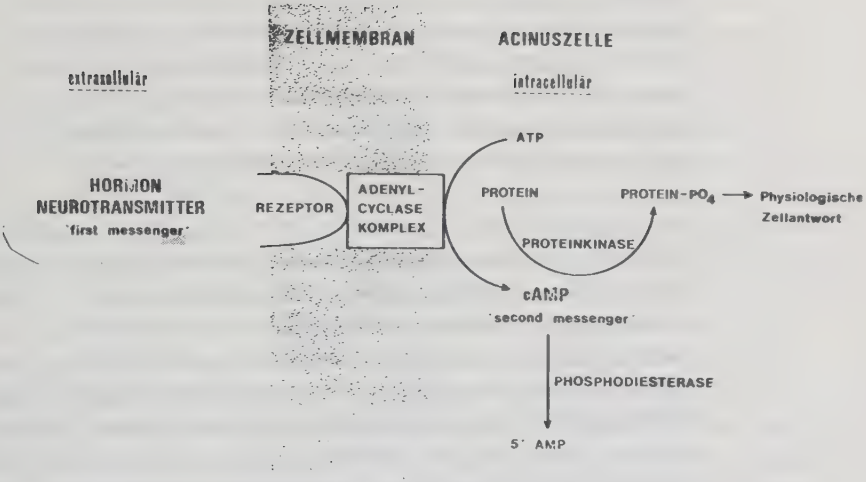

Abbildung 10: Funktionelle Einordnung des cyclischen AMP in die molekularen Mechanismen der Informations= übertragung.

Die bisherigen Befunde von SCHRAMM und NAIM (1970) an Parotisschnitten und von SCHMID et al. (1974) im Parotisspeichel ergaben, daß insbesondere eine Stimulation der ß-adrenergen Rezeptoren zu einer intensiven cAMP Bildung führt. Stimulation der alpha-Rezeptoren hat keinerlei Einfluß auf die cAMP-Exkretion. Die in dieser Arbeit gezeigte Steigerung der cAMP-Ausscheidung im Speichel nach Tyramin-Applikation und ihre Unterdrückbarkeit durch Propranolol lassen gleiche Schlußfolgerungen zu.

Die cAMP-Exkretion im Parotisspeichel ist bei verschiedenen Formen der arteriellen Hypertonie erhöht (SCHMID et al., 1975). Diese Erhöhung könnte für eine gesteigerte Sympatikusaktivität sprechen. Da jedoch die Acinuszellen der Parotisdrüse neben α - und ß-adrenergen Rezeptoren noch verschiedene andere Rezeptoren aufweisen, könnte diese cAMP Erhöhung beim Hochdruck auch durch andere Substanzen bedingt sein. So ist bekannt, daß Angiotensin II, dessen wesentliche Wirkung die Vasokonstriktion ist, Einflüsse auf die Speicheldrüsenfunktion hat. Es war daher interessant, die Wirkung vasoaktiver Substanzen auf die Speicheldrüsenfunktion zu testen.

Angiotensin II führte, wie in Abbildung 7 gezeigt ist, zu einem Anstieg der cAMP-Exkretion im Parotisspeichel. Dieser Anstieg setzt nach einer Latenzzeit von etwa 10-15 Minuten ein, erreicht etwa 10 Minuten später ein Maximum mit Werten von 200-300% der Kontrollen und normalisiert sich trotz weiterer Angiotensininfusion nach weiteren 10-15 Minuten. Dieser Befund könnte für direkte Angiotensin-II-Wirkungen an der Parotisdrüse sprechen. In der Literatur bestehen jedoch Hinweise, daß Angiotensin II Katecholaminfreisetzung induziert und die Katecholaminsynthese steigern kann. Außerdem vermag Angiotensin II durch Angriff an der Area postrema die Aktivität des zentralen Sympathicus zu steigern.

Es ist daher offen, ob die Angiotensin II-induzierten Speicheleffekte durch direkten oder indirekten Angriffspunkt ausgelöst sind.

Um Hinweise zu bekommen, ob der Angiotensin-II-Effekt an der Parotisdrüse über Zwischenschaltung des Sympathicus erfolgt, führten wir bei einem weiteren Rattenkollektiv vor der Angiotensin-II-Applikation eine Katecholaminentspeicherung durch Reserpingabe durch. Reserpin führt in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht praktisch zu einer völligen Entleerung der Noradrenalinspeicher (JONASON,1969). Abbildung 8 gibt den Angiotensineffekt auf die cAMP-Ausscheidung der Parotisdrüse nach Reserpinbehandlung wieder. Wie die Abbildung zeigt, läßt sich bei diesen Tieren die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel durch Angiotensin II nicht mehr steigern. Der Befund spricht für eine Zwischenschaltung des Sympatikus und gegen direkte Angriffspunkte des Angiotensin II an den Drüsenzellen der Parotis, soweit es sich um cAMP abhängige Mechanismen handelt. Es ist durch die Versuchsanordnung nicht zu entscheiden, ob Angiotensin II durch Noradrenalinfreisetzung und Stimulation der Parotisdrüse auf humoralem Weg oder über den zentralen Sympatikus wirkt. Versuche mit Denervierung wären zusätzlich angebracht, um diese Frage zu entscheiden.

Da unter Angiotensin-II-Infusion nur ein vorübergehender cAMP-Anstieg im Parotisspeichel nachzuweisen ist, spricht dieser Befund eher für eine zusätzliche Freisetzung von gespeichertem Noradrenalin und weniger für eine vermehrte Angiotensin-II-induzierte Noradrenalinsynthese. Hier wäre somit eine anhaltende Erhöhung der cAMP-Ausscheidung zu erwarten.

Abbildung 11 zeigt eine Vorstellung von CHALMERS über die Angiotensin-II-Effekte bei der neuronalen Informationsübertragung. Nach dieser Abbildung würde Angiotensin II über präsynaptische Rezeptoren die Noradrenalin-Freisetzung fördern. Es ist zu erwähnen, daß nach dieser Abbildung Prostaglandin E einen negativen Mechanismus auf die Noradrenalinfreisetzung hat. Untersuchungen nach Gabe von Acetylsalizylsäure (Aspisol^{R}), einem Prostaglandinsynthesehemmer, kommt es ebenfalls zu einem kurzfristigen geringen cAMP Anstieg im Parotisspeichel (unveröffentlichte Befunde). Dieser Befund könnte entsprechend dieser Abbildung durch eine Hemmung der Prostaglandinsynthese und dadurch wegfallender Hemmung der Noradrenalin-Freisetzung bedingt sein.

Da anzunehmen ist, daß Angiotensin II über Freisetzung von Naoradrenalin die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel steigert, wurde in einer Paralleluntersuchung der Effekt von Tyramin auf die cAMP-Exkretion im Parotisspeichel untersucht. Tyramin führt bekanntlich zu einer gesicherten Noradrenalin-Freisetzung aus den neuronalen Vesikeln. Wie Abbildung 6 zeigt, führt Tyramin, ähnlich wie Angiotensin II zu einem vorübergehenden cAMP-Anstieg im Parotisspeichel, der etwa 30 Minuten anhält und das Maximum etwa um den Faktor 2 über dem Kontrollwert liegt. Auch dieser Befund unterstützt die Annahme, daß Angiotensin II auf die Speicheldrüse der Ratte über Noradrenalin-Freisetzung wirkt.

KREUSSER et al. (1974) zeigten, daß Angiotensin II im Submandibulspeichel der Katze zu Elektrolytveränderungen führt, die das Bild sowohl einer alpha- als auch beta-adrenergen Stimulation zeigt. Dieser Befund wäre durchaus in Einklang zu bringen mit der Annahme einer Noradrenalin-Freisetzung und Stimulation dieser beiden adrenergen Rezeptoren.

Abbildung 11: Neuronale Informationsübertragung (nach CHALMERS)

Neben Angiotensin II wurde als weiteres vasoaktives Peptid auch Bradykinin getestet. Bradykinin führt zu einem Blutdruckabfall durch direkte Wirkung an der Gefäßmuskulatur und Vasodilatation. Es gibt vereinzelt Befunde, die zeigen, daß Bradykinin ebenfalls Katecholamine freisetzen kann. Nach unseren Untersuchungen führt Bradykinin zu keinem Anstieg der cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel. Dieser Befund spricht dafür, daß vermutlich keine direkten Angriffspunkte des Bradykinin an den Parenchymzellen der Drüse bestehen, zumindest soweit es sich um cAMP-abhängige Vorgänge handelt. Indirekte Effekte durch Einschaltung des Sympatikus, ähnlich den Angiotensin-II-Effekten, konnten nicht sicher nachgewiesen werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Cyclisches AMP wird im Parotisspeichel der Ratte (unter parasympatischer Stimulation mit Pilocarpin) in einer Menge von 20-30 fmol/min ausgeschieden. Die Wege der cAMP-Sekretion in die Speichelflüssigkeit und die Funktion des cAMP im Speichel sind bislang ungeklärt. Es ist bekannt, daß ß-adrenergische Stimulation die cAMP-Ausscheidung im Parotisspeichel stark stimulieren kann. Alpha-adrenerge Stimulation hat keinen Einfluß auf die cAMP-Exkretion.

Angiotensin II führt, intravenös infundiert, zu einem vorübergehenden Anstieg der cAMP-Exkretion. Dieser Angiotensin II induzierte Effekt auf das Speichel-cAMP dürfte durch indirekte Angriffspunkte des Angiotensin II verursacht sein, da sich dieser Effekt durch Reserpinvorbehandlung und damit durch Katecholamin-Entspeicherung der Parotisdrüse hemmen läßt. Vermutlich sind die Angiotensin-II-Effekte auf die Speicheldrüse über eine Zwischenschaltung des sympathoadrenalen Systems zu erklären. Dafür würde auch sprechen, daß Tyramin, das bekanntlich zu einer Noradrenalin-Freisetzung aus dem Speichelgranular führt, auf die cAMP-Exkretion im Parotisspeichel der normotensiven Ratte ähnliche Effekte wie Angiotensin II hat. Vermutlich erfolgt der Angiotensin II induzierte cAMP-Anstieg im Speichel über eine durch praesynaptischen Angriffspunkt verursachte Katecholamin-Freisetzung.

Bradykinin, als vasoaktives Peptid mit vasodilatatorischer Wirkung, hat keinen sicheren Effekt auf die Funktion der Parotisdrüsen, soweit es sich um cAMP-abhängige Vorgänge handelt.

L I T E R A T U R

BUTCHER, F.R.
Calcium and cyclic nucleotides in the regulation of secretion from the rat parotid by autonomic agonists.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9: 707 (1978)

CHALMERS, J.P.
Nervous system and hypertension.
Clin. Sci. Molec. Med. 55: 45s-56s (1978)

CORONEO, M.Th.
A partial isolation and perfusion study of the rat mandibular and sublingual glands.
Thesis Med. (1977)

HEALY, J.K., FRASER, P.A., YOUNG, J.A.
Inhibition of sodium transport by angiotensin II in the main duct of the rabbit mandibular gland isolated and perfused in vitro.
Pflügers Arch. 363, 69-73 (1976)

JONASON, J.
Effects of Reserpine on the Noradrenaline Content of Atrophied Rat Salivary Glands.
Acta physiol. scand. 75: 73-77 (1969)

KANAMORI, T., HAYAKAWA, T. und NAGATSU, T.
Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and amylase secretion from rat parotid gland.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 57: 394 (1974)

KREUSSER, W.
Sympatho- und parasympathomimetische Wirkungen des Angiotensin II. Untersuchungen des transepithelialen Stofftransports der isoliert perfundierten Katzensubmandibularis.
Inaugural Dissertation, Univ. Würzburg (1974)

KREUSSER, W., PINNOW, E., HENNEMANN, H. und HEIDLAND, A.
Einfluß von Angiotensin II auf die Elektrolyt- und Proteinexkretion der Katzensubmandibularis.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 80: 204-206 (1974)

RUDICH, L. und BUTCHER, F.R.
Effect of substance P and eledoisin on K^+efflux, amylase release and cyclic nucleotide levels in slices of rat parotid gland.
Biochem. Biophys. Acta 444: 704 (1976)

SCHAEFFER, L.D. SPROLES, A. und KRAKOWSKI, A.
Detection of cyclic AMP in parotid saliva of normal individuals.
J. Dent. Res. 52: 629 (1973)

SCHMID, G., FRICKE, L. und HEMPEL, K.
Cyclisches AMP im Parotisspeichel des Menschen.
In: Nieren- und Hochdruckkrankheiten 6 (10. Sympos. Ges. Nephrol.): 15 (1974)

SCHMID, G., HEMPEL, K., FRICKE, L., WERNZE, H. und HEIDLAND, A.
Erhöhte cAMP-Konzentration im Parotisspeichel des Menschen bei arterieller Hypertonie. Beziehungen zur Plasma-Renin-Aktivität.
Dtsch. med. Wschr. 100: 1435 (1975)

SCHMID, G., STÄHLIN, F.O., HEMPEL, K. und HEIDLAND, A.
cAMP secretion in parotid saliva: a model for ß-adrenergic activity. In vivo experiments in rats.
Arch. Pharmacol. 294: R 20 (1976)

SCHMID, G., NEFF, N., HEMPEL, K. und HEIDLAND, A.
BAEE Esterase (Kallikrein-Like Activity in Parotid Saliva of Normal Rats and Rats with Various Forms of Experimental Hypertension (Genuine, Renovascular and DOCA Salt Hypertension).
Contr. Nephrol. 19: 124-133 (1980)

SCHMID, G.
Cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat in Gehirn und Speicheldrüse bei arterieller Hypertonie.
Habilitationsschrift, Würzburg (1980)

SCHRAMM, M. und NAIM, E.
Adenyl cyclase of rat parotid gland. Activation by fluoride and norepinephrine.
J. Biol. Chem. 245: 3225 (1970)

SCHRAMM, M. und SELINGER, Z.
The functions of cyclic AMP and calcium as alternative second messengers in parotid gland and pancreas.
J. Cyclic Nucleotide Res. 1: 181 (1975)

Herrn Professor Dr.med A.Heidland und Herrn Priv.-Doz. Dr.med G.Schmid danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, sowie die ständige Unterstützung bei der praktischen und theoretischen Bearbeitung.

Ebenso geht mein Dank an Herrn Professor Dr.med Dr.rer nat K.Hempel für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Nofz
Vorname:	Klaus Günter
geboren am:	21.03.1950
in:	Bad Hersfeld
Mutter:	Anneliese Nofz, geb. Wehert, Stenotypistin
Vater:	Herbert Nofz, Installateur

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1956 - 60	Volksschule in Bad Hersfeld
1960 - 68	Gymnasium "Alte Klosterschule" in Bad Hersfeld, Abschluß: Abitur im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig
1968 - 71	Bundeswehr, Soldat auf Zeit
1971 - 74	Studium der Medizin, Vorklinik in Marburg/L.
1974 - 77	Studium der Medizin, Klinik in Würzburg
1977 - 78	Praktisches Jahr in Schweinfurt/M. und Würzburg
Mai 1978	Staatsexamen (schriftl. und mündl. Prüfung nach neuer AO)
Okt.78-Febr.79	Assistenzarzt Chirurgie Marienhospital in Herne
Apr.79-Aug.79	Assistenzarzt im Bakteriologisch-serologischen Institut der Stadt Bochum
seit Sept.79	Assistenzarzt, Anaesthesie und Intensivmedizin St. Vincentius-Krankenhaus in Speyer

(Günter Nofz)